

PCT/EP2004/008390

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

REC'D 02 SEP 2004
WIPO PCT

27.07.2004



**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 103 35 253.8
Anmeldetag: 1. August 2003
Anmelder/Inhaber: Degussa AG, 40474 Düsseldorf/DE
Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung von L-Threonin
IPC: C 12 P, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 6. Juli 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

schäfer

Verfahren zur Herstellung von L-Threonin

Gegenstand der Erfindung ist ein verbessertes Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Threonin unter Verwendung von Bakterien der Familie Enterobacteriaceae.

5. Stand der Technik

L-Threonin findet in der Humanmedizin, in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, dass L-Threonin durch Fermentation von Stämmen der Familie der Enterobacteriaceae, insbesondere *Escherichia coli* und *Serratia marcescens*, hergestellt werden kann. Wegen der großen Bedeutung dieser Aminosäure wird ständig an der Verbesserung der Herstellungsverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können
15 fermentationstechnische Maßnahmen, wie z.B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie z.B. die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform, durch z.B. Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen,
20 d.h. die genetisch bedingten Leistungseigenschaften des Bakteriums selbst betreffen.

Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich die Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von L-
25 Threonin bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist ein Fermentationsverfahren, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man

30 a) ein L-Threonin produzierendes Bakterium der Familie Enterobacteriaceae in mindestens einem ersten Nährmedium inokuliert und kultiviert,

b) anschließend mindestens ein weiteres Nährmedium oder mehrere weitere Nährmedien in einem oder mehreren Zufütterungsströmen der Kultur kontinuierlich zuführt, wobei das weitere Nährmedium oder die weiteren Nährmedien mindestens eine Kohlenstoffquelle, mindestens eine Stickstoffquelle und mindestens eine Phosphorquelle enthalten, unter Bedingungen die die Bildung von L-Threonin erlauben, und gleichzeitig der Kultur Kulturbrühe mit mindestens einem oder mehreren Entnahmeströmen entnimmt, der oder die im wesentlichen dem Zufütterungsstrom oder der Summe der Zufütterungsströme entspricht/entsprechen, wobei

c) die Konzentration der Kohlenstoffquelle(n) während der Kultivierung bei maximal 10 g/l eingestellt wird, und

d) die Ausbeute des gebildeten L-Threonins bezogen auf die eingesetzte Kohlenstoffquelle mindestens 37 Gew.-% beträgt, und

e) L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 2,5 g/l pro Std. gebildet wird.

Erfundungsgemäß kann die Anlagenleistung einer L-Threonin produzierenden Fermentationseinheit dadurch gesteigert werden, dass man in dem oben beschriebenen ersten Kultivierungsschritt (a) nach dem Satzverfahren (batch) oder Zulaufverfahren (fed batch) kultiviert, wobei bei Verwendung des Zulaufverfahrens mindestens ein Zusatz-Nährmedium eingesetzt wird. In dem beschriebenen Kultivierungsschritt (b) werden mindestens ein weiteres Nährmedium oder mehrere weitere Nährmedien in einem oder mehreren Zufütterungsströmen der Kultur kontinuierlich zugeführt und gleichzeitig wird der Kultur Kulturbrühe mit mindestens einem oder mehreren Entnahmeströmen entnommen,

der oder die im wesentlichen dem Zufütterungsstrom oder der Summe der Zufütterungsströme entspricht/entsprechen.

Während des Kultivierungsschrittes (a) wird das Bakterium in mindestens einem ersten Nährmedium inkuliert und nach 5 dem Satzverfahren (batch) oder Zulaufverfahren (fed batch) kultiviert. Bei Verwendung des Zulaufverfahrens wird nach mehr als 0 bis maximal 10 Stunden, vorzugsweise nach 1 bis 10 Stunden, bevorzugt nach 2 bis 10 Stunden und besonders bevorzugt nach 3 bis 7 Stunden ein Zusatz-Nährmedium 10 zugeführt.

Das erste Nährmedium enthält als Kohlenstoffquelle eine oder mehrere der Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Saccharose, Melasse aus Zuckerrüben oder Zuckerröhr, Fruktose, Glukose, Stärkehydrolysat, Laktose, Galaktose, 15 Maltose, Xylose, Essigsäure, Ethanol und Methanol in den Konzentrationen von 1 bis 50 g/kg, bevorzugt von 10 bis 45 g/kg, besonders bevorzugt von 20 bis 40 g/kg. Unter Stärkehydrolysat versteht man erfindungsgemäß das Hydrolysat von Stärke aus Mais, Getreide, Kartoffeln oder 20 Tapioka.

Als Stickstoffquelle im ersten Nährmedium können organische, Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen 25 wie Ammoniak, Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat Kaliumnitrat, Kaliumnatriumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung in den Konzentrationen von 1 bis 40 g/kg, bevorzugt von 10 bis 30 g/kg, besonders bevorzugt von 10 bis 25 g/kg verwendet 30 werden.

Als Phosphorquelle im ersten Nährmedium können Phosphorsäure, Alkali- oder Erdalkalisalze der Phosphorsäure, insbesondere Kaliumdihydrogenphosphat oder

Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze, Polymere der Phosphorsäure oder das Hexaphosphorsäureester des Inosits auch Phytinsäure genannt in den Konzentrationen von 0,1 bis 5 g/kg, bevorzugt von 5 0,3 bis 3 g/kg, besonders bevorzugt von 0,5 bis 1,5 g/kg verwendet werden. Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Diese Substanzen liegen in den Konzentrationen von 0,003 bis 3 10 g/kg vor. Schließlich werden essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren (z.B. Homoserin) und Vitamine (z.B. Thiamin) zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden.

15 Das Zusatz-Nährmedium, welches in einem Zulaufverfahren (fed batch) angewandt wird, enthält im allgemeinen lediglich als Kohlenstoffquelle eine oder mehrere der Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Saccharose, Melasse aus Zuckerrüben oder Zuckerrohr, Fruktose, Glukose, 20 Stärkehydrolysat, Laktose, Galaktose, Maltose, Xylose, Essigsäure, Ethanol und Methanol in den Konzentrationen von 300 bis 700 g/kg, bevorzugt von 400 bis 650 g/kg, und gegebenenfalls eine anorganische Stickstoffquelle wie z.B. Ammoniak, Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, 25 Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat, Ammoniumnitrat, Kaliumnitrat oder Kaliumnatriumnitrat. Alternativ können diese und andere Komponenten auch separat zugefüttert werden.

Es wurde gefunden, dass die Bestandteile des weiteren 30 Nährmediums in Form eines einzigen weiteren Nährmediums sowie in einer Vielzahl von weiteren Nährmedien der Kultur zugeführt werden können. Erfindungsgemäß wird das weitere Nährmedium beziehungsweise werden die weiteren Nährmedien in mindestens einem (1) Zufütterungsstrom oder in einer 35 Vielzahl an Zufütterungsströmen mindestens 2 bis 10,

vorzugsweise 2 bis 7 oder 2 bis 5 Zufütterungsströmen der Kultur zugeführt.

Das weitere Nährmedium bzw. die weiteren Nährmedien enthält/enthalten als Kohlenstoffquelle eine oder mehrere

5 der Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Saccharose, Melasse aus Zuckerrüben oder Zuckerrohr, Fruktose, Glukose, Stärkehydrolysat, Maltose, Xylose, Essigsäure, Ethanol und Methanol in den Konzentrationen von 20 bis 700 g/kg, bevorzugt von 50 bis 650 g/kg.

10 Weiterhin enthält das weitere Nährmedium bzw. enthalten die weiteren Nährmedien eine Stickstoffquelle bestehend aus organischen, Stickstoff-haltigen Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen 15 wie Ammoniak, Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat, Ammoniumnitrat und/oder Kaliumnitrat oder Kaliumnatriumnitrat. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung in den Konzentrationen von 5 bis 50 g/kg, bevorzugt von 10 bis 40 20 g/kg, verwendet werden.

Weiterhin enthält das weitere Nährmedium bzw. enthalten die weiteren Nährmedien eine Phosphorquelle bestehend aus Phosphorsäure, Alkali- oder Erdalkalisalze der

25 Phosphorsäure, insbesondere Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze, Polymere der Phosphorsäure oder das Hexaphosphorsäureester des Inosits auch Phytinsäure genannt. Die Phosphorquellen können einzeln oder als Mischung in den Konzentrationen von 0,3 bis 3 g/kg,

30 bevorzugt von 0,5 bis 2 g/kg verwendet werden. Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind, in den Konzentrationen von 0,003 bis 3 g/kg, bevorzugt in den Konzentrationen von 0,008 bis 35 2 g/kg. Schließlich werden essentielle Wuchsstoffe wie

Aminosäuren (z.B. Homoserin) und Vitamine (z.B. Thiamin) zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden.

- 5 Bei Verwendung eines einzigen weiteren Nährmediums wird dieses typischerweise in einem Zufütterungsstrom der Kultur zugeführt. Bei Verwendung einer Vielzahl weiterer Nährmedien werden diese in einer entsprechenden Vielzahl an Zufütterungsströmen zugeführt. Bei der Verwendung einer
- 10 Vielzahl weiterer Nährmedien ist zu beachten, dass diese jeweils nur eine der beschriebenen Kohlenstoff-, Stickstoff-, oder Phosphorquellen enthalten können, aber auch eine Mischung von den beschriebenen Kohlenstoff-, Stickstoff-, oder Phosphorquellen.
- 15 Erfindungsgemäß wird das zugeführte Nährmedium oder die zugeführten Nährmedien so eingestellt, dass ein Phosphor zu Kohlenstoffverhältnis (P/C Verhältnis) von maximal 4; von maximal 3; von maximal 2; von maximal 1,5; von maximal 1; von maximal 0,7; von maximal 0,5; maximal 0,48; maximal
- 20 0,46; maximal 0,44; maximal 0,42; maximal 0,40; maximal 0,38; maximal 0,36; maximal 0,34; maximal 0,32; maximal 0,30 mmol Phosphor / mol Kohlenstoff besteht.

Der Zufütterungsstrom oder die Summe der Zufütterungsströme in dem erfindungsgemäßen Verfahren werden mit einer Geschwindigkeit entsprechend einer mittleren Verweilzeit von kleiner als 30 Stunden, bevorzugt kleiner als 25, ganz besonders bevorzugt kleiner als 20 Stunden hinzugeführt. Dabei ist die mittlere Verweilzeit (residence time) die theoretische Zeit, die Teilchen in einer kontinuierlich betriebenen Kultur verbleiben. Die mittlere Verweilzeit wird beschrieben durch das Verhältnis des Flüssigkeitsvolumens des Reaktors und der Durchflussmenge (Biotechnologie; H. Weide, J. Páca und W. A. Knorre; Gustav Fischer Verlag Jena; 1991).

Starkes Wachstum zu Beginn der Kultivierung ist normalerweise eine logarithmische Wachstumsphase. Der logarithmischen Wachstumsphase folgt im allgemeinen eine Phase von geringerem Zellwachstum als in der

5 logarithmischen Phase.

Nach 10 bis 72 Stunden, vorzugsweise 15 bis 48 Stunden, bzw. während oder nach der logarithmischen Wachstumsphase wird wie oben beschrieben mindestens ein weiteres Nährmedium oder mehrere weitere Nährmedien in einem oder 10 mehreren Zufütterungsströmen der Kultur kontinuierlich zuführt und gleichzeitig der Kultur Kulturbrühe mit mindestens einem oder mehreren Entnahmeströmen entnommen, der oder die im wesentlichen dem Zufütterungsstrom oder der 15 Summe der Zufütterungsströme entspricht/entsprechen. Im wesentlichen bedeutet hier, dass die Geschwindigkeit des Entnahmestroms oder der Entnahmeströme 80% - 120%, 90% - 110% des Zufütterungsstroms oder der Summe der Zufütterungsströme entspricht. Die Entnahme kann durch 20 Abpumpen und oder durch Ablassen der Kulturbrühe technisch realisiert werden.

Erfindungsgemäß wird die Konzentration der Kohlenstoffquelle während der Kultivierung bei maximal 10 g/l, bevorzugt bei maximal 5 g/l, besonders bevorzugt maximal 2 g/l eingestellt. Dabei wird die Konzentration der Kohlenstoffquelle anhand von Methoden bestimmt, die Stand 25 der Technik sind. β -D-Glukose wird z.B. in einem Glukoseanalysator YSI 02700 Select der Firma Yello Springs Instruments (Yellow Springs, Ohio, USA) bestimmt.

Gegebenenfalls kann die entnommene Kulturbrühe mit 30 Sauerstoff oder einem sauerstoffhaltigen Gas versehen werden bis die Konzentration der Kohlenstoffquelle unter 2 g/l; unter 1 g/l; oder unter 0,5 g/l sinkt.

Erfindungsgemäß beträgt die Ausbeute mindestens 37 Gew.-%; mindestens 40 Gew.-%; mindestens 42 Gew.-%; mindestens 44

Gew.-%; mindestens 46 Gew.-%, mindestens 48 Gew.-% betragen. Dabei ist die Ausbeute definiert als das Verhältnis von der in einer Kultivierung gesamt gebildeten Menge an L-Threonin zu der Gesamtmenge der eingesetzten

5 oder verbrauchten Kohlenstoffquelle.

Erfindungsgemäß wird L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 2,5 bis 3,5 g/l pro Std., von mindestens 2,5 bis mehr als 3,5 g/l pro Std., von mindestens 3,5 bis 5,0 g/l pro Std., von mindestens 3,5 bis 10 mehr als 5,0 g/l pro Std., oder von mindestens 5,0 bis 8,0 g/l oder mehr pro Std. gebildet. Dabei ist die Raum-Zeit-Ausbeute definiert als das Verhältnis von der in einer Kultivierung gesamt gebildeten Threoninmenge zu dem aktiv produzierenden Volumen der Kultur über den gesamten

15 Zeitraum der Kultivierung gesehen. Die Raum-Zeit-Ausbeute wird auch volumetrische Produktivität genannt.

Während der Kultivierung wird die Temperatur in einem Bereich von 29 bis 42°C, vorzugsweise von 33 bis 40°C, eingestellt. Die Kultivierung kann bei Normaldruck oder 20 gegebenenfalls bei Überdruck, vorzugsweise bei 0 bis 1,5 bar Überdruck durchgeführt werden. Der Sauerstoffpartialdruck wird auf 5 bis 50%, vorzugsweise ca. 25 20%, Luftsättigung geregelt. Dabei wird die Kultur gerührt und mit Sauerstoff versorgt. Die Regelung des pH-Wertes auf pH ca. 6 bis 8, vorzugsweise 6,5 bis 7,5 kann mit 25%igem Ammoniakwasser erfolgen.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird 72 Stunden vorzugsweise 100 bis 200 besonders bevorzugt 200 bis \geq 300 Stunden betrieben. Dabei wird das Volumen der Kultur mindestens ein 30 halbes Mal, mindestens 2 Mal, mindestens 4 Mal, mindestens 6 Mal, mindestens 8 Mal, mindestens 10 Mal, mindestens 12 Mal ausgetauscht.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind L-Threonin produzierende Bakterien der Familie

Enterobacteriaceae, ausgewählt aus den Gattungen Escherichia, Erwinia, Providencia und Serratia geeignet.

Die Gattungen Escherichia und Serratia werden bevorzugt.

Bei der Gattung Escherichia ist insbesondere die Art

5 Escherichia coli und bei der Gattung Serratia insbesondere die Art Serratia marcescens zu nennen.

Die Bakterien enthalten mindestens eine Kopie eines thrA-Gens oder Allels, das für eine Threonin-insensitive Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I kodiert.

10 Derartige Bakterien sind typischerweise resistent gegen das Threoninanalogon α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure (AHV).

Darüber hinaus sind Bakterien der Familie Enterobacteriaceae geeignet, die ein Stopkodon ausgewählt aus der Gruppe opal, ochre und amber, bevorzugt amber im rpoS-Gen und einen t-RNA-Suppressor ausgewählt aus der Gruppe opal-Suppressor, ochre-Suppressor und amber-Suppressor, bevorzugt amber-Suppressor enthalten. Die amber-Mutation liegt vorzugsweise an der Position 33 entsprechend der Aminosäuresequenz des RpoS-Genproduktes.

20 Als amber-Suppressor wird vorzugsweise supE eingesetzt. Diese Bakterien sind in PCT/EP02/02055 beschrieben.

Die Nukleotidsequenz des rpoS-Gens kann dem Stand der Technik entnommen werden. Die Nukleotidsequenz des rpoS-Gens entsprechend der Accession No. AE000358 ist als SEQ ID NO. 1 dargestellt. Die Aminosäuresequenz des dazugehörigen RpoS-Genproduktes bzw. Proteins ist in der SEQ ID NO. 2 dargestellt. Die Nukleotidsequenz eines rpoS-Allels, das ein Stopkodon vom Typ amber an der Stelle der Nukleotidsequenz entsprechend Position 33 der Aminosäuresequenz des RpoS-Genproduktes bzw. Proteins, entsprechend SEQ ID NO. 1 bzw. SEQ ID NO. 2, enthält, ist in SEQ ID NO. 3 wiedergegeben. Der Suppressor supE ist ebenfalls im Stand der Technik beschrieben und als SEQ ID NO. 4 dargestellt.

Es ist ebenfalls möglich aus der entnommenen Kulturbrühe (=Fermentationsbrühe) ein Produkt herzustellen, indem man die in der Kulturbrühe enthaltene Biomasse des Bakteriums vollständig (100%) oder nahezu vollständig d.h. mehr als 5 oder größer als (>) 90%, >95%, >97%, >99% entfernt und die übrigen Bestandteile der Fermentationsbrühe weitgehend d.h. zu 30% - 100%, 40% - 100%, 50% - 100%, 60% - 100%, 70% - 100%, 80% - 100%, oder 90% - 100%, bevorzugt größer gleich (≥) 50%, ≥60%, ≥70%, ≥80%, ≥90% oder ≥95% oder auch 10 vollständig (100%) im Produkt belässt.

Zur Entfernung oder Abtrennung der Biomasse werden Separationsmethoden wie beispielsweise Zentrifugation, Filtration, Dekantieren, Flockung oder eine Kombination hieraus eingesetzt.

15 Die erhaltene Brühe wird anschließend mit bekannten Methoden wie beispielsweise mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers, durch Umkehrosmose, durch Nanofiltration oder einer Kombination hieraus eingedickt 20 beziehungsweise konzentriert.

Diese aufkonzentrierte Brühe wird anschließend durch Methoden der Gefriertrocknung, der Sprühtröcknung, der Sprühgranulation oder durch anderweitige Verfahren zu einem vorzugsweise rieselfähigen, feinteiligen Pulver 25 aufgearbeitet. Dieses rieselfähige, feinteilige Pulver kann dann wiederum durch geeignete Kompaktier- oder Granulier-Verfahren in ein grobkörniges, gut rieselfähiges, lagerbares und weitgehend staubfreies Produkt überführt werden. Das Wasser wird hierbei insgesamt zu mehr als 90% 30 entfernt, sodass der Wassergehalt im Produkt kleiner als 10%, kleiner als 5% beträgt.

Die angegebenen Verfahrensschritte müssen nicht notwendigerweise in der hier aufgeführten Reihenfolge

durchgeführt sondern können gegebenenfalls in technisch sinnvoller Weise kombiniert werden.

Die Analyse von L-Threonin und anderen Aminosäuren kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender

5 Ninhhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry 30: 1190-1206 (1958)) beschrieben, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry 51: 1167-1174 (1979)) beschrieben.

Patentansprüche

1. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Threonin unter Verwendung von L-Threonin produzierenden Bakterien der Familie Enterobacteriaceae, dadurch gekennzeichnet, dass man

- 5 a) das Bakterium in mindestens einem ersten Nährmedium inokuliert und kultiviert,
- 10 b) anschließend mindestens ein weiteres Nährmedium oder weitere Nährmedien in einem oder mehreren Zufütterungsströmen der Kultur kontinuierlich zuführt, wobei das Nährmedium oder die Nährmedien mindestens eine Kohlenstoffquelle, mindestens eine Stickstoffquelle und mindestens eine Phosphorquelle enthalten, unter Bedingungen die die Bildung von L-Threonin erlauben und gleichzeitig der Kultur Kulturbrühe mit mindestens einem oder mehreren Entnahmeströmen entnimmt, der oder die im wesentlichen dem Zufütterungsstrom oder der Summe der Zufütterungsströme entspricht/entsprechen, wobei
- 15 c) die Konzentration der Kohlenstoffquelle während der Kultur bei maximal 10 g/l eingestellt wird, und
- 20 d) die Ausbeute des gebildeten L-Threonins bezogen auf die eingesetzte Kohlenstoffquelle mindestens 37 Gew.-% beträgt, und
- 25 e) L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 2,5 g/l pro Std. gebildet wird.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Kultivierungsschritt (a) nach dem Satzverfahren (batch) durchgeführt wird.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Kultivierungsschritt (a) nach dem Zulaufverfahren (fed batch) durchgeführt wird, wobei mindestens ein Zusatz-Nährmedium eingesetzt wird.
- 5 4. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass das gebildete L-Threonin gereinigt wird.
- 10 5. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass man zunächst die Biomasse aus der entnommenen Kultur in Schritt (b) zu mindestens 90% entfernt und anschließend das Wasser zu mindestens 90% entfernt.
- 15 6. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Kohlenstoffquelle um eine oder mehrere der Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Saccharose, Melasse aus Zuckerrüben oder Zuckerrohr, Fruktose, Glukose, Stärkehydrolysat, Maltose, Xylose, Essigsäure, Ethanol und Methanol handelt.
- 20 7. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Stickstoffquelle um eine oder mehrere organische, Stickstoff-haltige Stoffe oder Stoffgemische ausgewählt aus der Gruppe Peptone, Hefeextrakte, Fleischextrakte, Malzextrakte, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff und/oder um eine oder mehrere der anorganischen Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Ammoniak, Ammonium-haltige Salze und Salze der Salpetersäure handelt.
- 25 8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei Ammonium-haltigen Salzen und Salzen der Salpetersäure um Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat, Ammoniumnitrat, Kaliumnitrat und Kaliumnatriumnitrat handelt.

9. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Phosphorquelle um Alkali- oder Erdalkalisalze der Phosphorsäure oder deren Polymere oder der Phytinsäure handelt.
- 5 10. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Alkalalisalzen der Phosphorsäure um Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze handelt.
- 10 11. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Geschwindigkeit des Entnahmestroms oder der Entnahmeströme 80% - 120%, 90% - 110% des Zufütterungsstroms oder der Summe der Zufütterungsströme entspricht.
- 15 12. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Bakterien der Familie Enterobacteriaceae um die Art *Escherichia coli* handelt.
- 20 13. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Bakterium der Familie Enterobacteriaceae mindestens ein *thrA*-Gen oder Allel enthält, das für eine Threonin-insensitive Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I kodiert.
- 25 14. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Bakterium der Familie Enterobacteriaceae ein Stopkodon ausgewählt aus der Gruppe opal, ochre und amber, bevorzugt amber im *rpoS*-Gen und einen t-RNA-Suppressor ausgewählt aus der Gruppe opal-Suppressor, ochre-Suppressor und amber-Suppressor, bevorzugt amber-Suppressor enthält.
- 30 15. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Zufütterungsstrom oder die Summe der Zufütterungsströme mit einer Geschwindigkeit

entsprechend einer mittleren Verweilzeit von kleiner 30 Stunden, bevorzugt kleiner 25, ganz besonders bevorzugt kleiner 20 Stunden hinzugeführt wird.

16. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in dem zugeführtem Nährmedium oder den zugeführten Nährmedien ein Phosphor zu Kohlenstoffverhältnis (P/C Verhältnis) von maximal 4; von maximal 3; von maximal 2; von maximal 1,5; von maximal 1; von maximal 0,7; von maximal 0,5; maximal 0,48; maximal 0,46; maximal 0,44; maximal 0,42; maximal 0,40; maximal 0,38; maximal 0,36; maximal 0,34; maximal 0,32; maximal 0,30 eingestellt wird.
17. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die entnommene Kulturbrühe mit Sauerstoff oder einem sauerstoffhaltigen Gas versehen wird bis die Konzentration der Kohlenstoffquelle unter 2 g/l; unter 1 g/l; unter 0,5 g/l sinkt.
18. Verfahren gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das gebildete L-Threonin gereinigt wird.
19. Verfahren gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass man zunächst die Biomasse aus der entnommenen Kultur in Schritt (b) zu mindestens 90% entfernt und anschließend das Wasser zu mindestens 90% entfernt.
20. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration der Kohlenstoffquelle während der Kultur bei maximal 5 g/l eingestellt wird.
21. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration der Kohlenstoffquelle während der Kultur bei maximal 2 g/l eingestellt wird.

22. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausbeute des gebildeten L-Threonins, bezogen auf die eingesetzte Kohlenstoffquelle, mindestens 48 Gew.-% beträgt.
- 5 23. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausbeute des gebildeten L-Threonins, bezogen auf die eingesetzte Kohlenstoffquelle, mindestens 44 Gew.-% beträgt.
- 10 24. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausbeute des gebildeten L-Threonins, bezogen auf die eingesetzte Kohlenstoffquelle, mindestens 40 Gew.-% beträgt.
- 15 25. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 5,0 bis mehr als 8,0 g/l pro Std. gebildet wird.
- 20 26. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 3,5 bis mehr als 5,0 g/l pro Std. gebildet wird.
- 25 27. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 2,5 bis mehr als 3,5 g/l pro Std. gebildet wird.
28. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein Zulaufverfahren im Kultivierungsschritt (a) angewandt wird, und dass L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 2,5 bis 5,0 g/l pro Std. gebildet wird.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein verbessertes Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Threonin unter Verwendung von L-Threonin produzierenden Bakterien der Familie

5 Enterobacteriaceae.

SEQUENZPROTOKOLL:

5 <110> Degussa AG

<120> Verfahren zur Herstellung von L-Threonin

10 <130> 030217 BT

<160> 4

15 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 993

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(990)

<223>

25

<400> 1

atg agt cag aat acg ctg aaa gtt cat gat tta aat gaa gat gcg gaa
Met Ser Gln Asn Thr Leu Lys Val His Asp Leu Asn Glu Asp Ala Glu

1 5 10 15

48

30

ttt gat gag aac gga gtt gag gtt ttt gac gaa aag gcc tta gta gaa
Phe Asp Glu Asn Gly Val Glu Val Phe Asp Glu Lys Ala Leu Val Glu
20 25 30

96

35

cag gaa ccc agt gat aac gat ttg gcc gaa gag gaa ctg tta tcg cag
Gln Glu Pro Ser Asp Asn Asp Leu Ala Glu Glu Leu Leu Ser Gln
35 40 45

144

gga gcc aca cag cgt gtg ttg gac gcg act cag ctt tac ctt ggt gag
Gly Ala Thr Gln Arg Val Leu Asp Ala Thr Gln Leu Tyr Leu Gly Glu
50 55 60

192

45

att ggt tat tca cca ctg tta acg gcc gaa gaa gtt tat ttt gcg
Ile Gly Tyr Ser Pro Leu Leu Thr Ala Glu Glu Val Tyr Phe Ala
65 70 75 80

240

50

cgt cgc gca ctg cgt gga gat gtc gcc tct cgc cgc cgg atg atc gag
Arg Arg Ala Leu Arg Gly Asp Val Ala Ser Arg Arg Arg Met Ile Glu
85 90 95

288

55

agt aac ttg cgt ctg gtg gta aaa att gcc cgc cgt tat ggc aat cgt
Ser Asn Ile Arg Leu Val Val Lys Ile Ala Arg Arg Tyr Gly Asn Arg
100 105 110

336

55

ggt ctg gcg ttg ctg gac ctt atc gaa gag ggc aac ctg ggg ctg atc
Gly Leu Ala Leu Leu Asp Leu Ile Glu Glu Gly Asn Leu Gly Leu Ile
115 120 125

384

60

cgc gcg gta gag aag ttt gac ccg gaa cgt ggt ttc cgc ttc tca aca
Arg Ala Val Glu Lys Phe Asp Pro Glu Arg Gly Phe Arg Phe Ser Thr
130 135 140

432

145	tac gca acc tgg tgg att cgc cag acg att gaa cgg gcg att atg aac Tyr Ala Thr Trp Trp Ile Arg Gln Thr Ile Glu Arg Ala Ile Met Asn 150 155 160	480
5	caa acc cgt act att cgt ttg ccg att cac atc gta aag gag ctg aac Gln Thr Arg Thr Ile Arg Leu Pro Ile His Ile Val Lys Glu Leu Asn 165 170 175	528
10	gtt tac ctg cga acc gca cgt gag ttg tcc cat aag ctg gac cat gaa Val Tyr Leu Arg Thr Ala Arg Glu Leu Ser His Lys Leu Asp His Glu 180 185 190	576
15	cca agt gcg gaa gag atc gca gag caa ctg gat aag cca gtt gat gac Pro Ser Ala Glu Glu Ile Ala Glu Gln Leu Asp Lys Pro Val Asp Asp 195 200 205	624
	gtc agc cgt atg ctt cgt ctt aac gag cgc att acc tcg gta gac acc Val Ser Arg Met Leu Arg Leu Asn Glu Arg Ile Thr Ser Val Asp Thr 210 215 220	672
	ccg ctg ggt ggt gat tcc gaa aaa gcg ttg ctg gac atc ctg gcc gat Pro Leu Gly Gly Asp Ser Glu Lys Ala Leu Asp Ile Leu Ala Asp 225 230 235 240	720
25	gaa aaa gag aac ggt ccg gaa gat acc acg caa gat gac gat atg aag Glu Lys Glu Asn Gly Pro Glu Asp Thr Thr Gln Asp Asp Asp Met Lys 245 250 255	768
30	cag agc atc gtc aaa tgg ctg ttc gag ctg aac gcc aaa cag cgt gaa Gln Ser Ile Val Lys Trp Leu Phe Glu Leu Asn Ala Lys Gln Arg Glu 260 265 270	816
35	gtg ctg gca cgt cga ttc ggt ttg ctg ggg tac gaa gcg gca aca ctg Val Leu Ala Arg Arg Phe Gly Leu Leu Gly Tyr Glu Ala Ala Thr Leu 275 280 285	864
40	gaa gat gta ggt cgt gaa att ggc ctc acc cgt gaa cgt gtt cgc cag Glu Asp Val Gly Arg Glu Ile Gly Leu Thr Arg Glu Arg Val Arg Gln 290 295 300	912
	att cag gtt gaa ggc ctg cgc cgt ttg cgc gaa atc ctg caa acg cag Ile Gln Val Glu Gly Leu Arg Arg Leu Arg Glu Ile Leu Gln Thr Gln 305 310 315 320	960
45	ggg ctg aat atc gaa gcg ctg ttc cgc gag taa Gly Leu Asn Ile Glu Ala Leu Phe Arg Glu 325 330	993
50	<210> 2 <211> 330 <212> PRT <213> Escherichia coli	
55	<400> 2 Met Ser Gln Asn Thr Leu Lys Val His Asp Leu Asn Glu Asp Ala Glu 1 5 10 15	
60	Phe Asp Glu Asn Gly Val Glu Val Phe Asp Glu Lys Ala Leu Val Glu 20 25 30	

Gln Glu Pro Ser Asp Asn Asp Leu Ala Glu Glu Leu Leu Ser Gln
 35 40 45

5 Gly Ala Thr Gln Arg Val Leu Asp Ala Thr Gln Leu Tyr Leu Gly Glu
 50 55 60

Ile Gly Tyr Ser Pro Leu Leu Thr Ala Glu Glu Glu Val Tyr Phe Ala
 65 70 75 80

10 Arg Arg Ala Leu Arg Gly Asp Val Ala Ser Arg Arg Arg Met Ile Glu
 85 90 95

Ser Asn Leu Arg Leu Val Val Lys Ile Ala Arg Arg Tyr Gly Asn Arg
 100 105 110

15 Gly Leu Ala Leu Leu Asp Leu Ile Glu Glu Gly Asn Leu Gly Leu Ile
 115 120 125

Arg Ala Val Glu Lys Phe Asp Pro Glu Arg Gly Phe Arg Phe Ser Thr
 130 135 140

Tyr Ala Thr Trp Trp Ile Arg Gln Thr Ile Glu Arg Ala Ile Met Asn
 145 150 155 160

25 Gln Thr Arg Thr Ile Arg Leu Pro Ile His Ile Val Lys Glu Leu Asn
 165 170 175

Val Tyr Leu Arg Thr Ala Arg Glu Leu Ser His Lys Leu Asp His Glu
 180 185 190

30 Pro Ser Ala Glu Glu Ile Ala Glu Gln Leu Asp Lys Pro Val Asp Asp
 195 200 205

35 Val Ser Arg Met Leu Arg Leu Asn Glu Arg Ile Thr Ser Val Asp Thr
 210 215 220

Pro Leu Gly Gly Asp Ser Glu Lys Ala Leu Leu Asp Ile Leu Ala Asp
 225 230 235 240

40 Glu Lys Glu Asn Gly Pro Glu Asp Thr Thr Gln Asp Asp Asp Met Lys
 245 250 255

Gln Ser Ile Val Lys Trp Leu Phe Glu Leu Asn Ala Lys Gln Arg Glu
 260 265 270

45 Val Leu Ala Arg Arg Phe Gly Leu Leu Gly Tyr Glu Ala Ala Thr Leu
 275 280 285

50 Glu Asp Val Gly Arg Glu Ile Gly Leu Thr Arg Glu Arg Val Arg Gln
 290 295 300

Ile Gln Val Glu Gly Leu Arg Arg Leu Arg Glu Ile Leu Gln Thr Gln
 305 310 315 320

55 Gly Leu Asn Ile Glu Ala Leu Phe Arg Glu
 325 330

<210> 3
 <211> 993
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Allel
 <222> (1)..(990)
 <223> rpos-Allel
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (97)..(99)
 <223> amber-Kodon
 10
 <400> 3
 atgagtcaga atacgctgaa agttcatgat ttaaatgaag atgcggaatt tgatgagaac 60
 ggagttgagg ttttgacga aaaggcctta gtagaatagg aacccagtga taacgatttg
 15
 gccgaagagg aactgttatac gcagggagcc acacagcgtg tttggacgc gactcagctt
 taccttggtg agattggta ttcaccactg ttaacggccg aagaagaagt ttatggcg 240
 cgtcgacac tgcgtggaga tgcgtcctct cgccgccgga tgatcgagag taacttgcgt
 ctggtggtaa aaattgcccgcg ccgttatggc aatcggttc tggcggtgct ggaccttatac
 25
 gaagagggca acctggggct gatccgcgcg gtagagaagt ttgacccgga acgtggtttc
 cgcttctcaa catacgcaac ctggtgatt cgccagacga ttgaacgggc gattatgaac
 caaaccgtt ctattcgaaa ggcattcac atcgtaaagg agctgaacgt ttacctgcga
 30
 accgcacgtg agttgtccca taagctggac catgaaccaa gtgcggaaga gatcgacag
 caactggata agccagttga tgacgtcagc cgtatgcttc gtcttaacga ggcattacc
 tcggtagaca ccccgctggg tggtgattcc gaaaaagcgt tgctggacat cctggccgat
 35
 gaaaaagaga acggtccgga agataaccacg caagatgacg atatgaagca gagcatcgac
 aaatggctgt tcgagctgaa cgccaaacag cgtgaagtgc tggcacgtcg attcggtttg
 ctgggtacg aagcggcaac actggaagat gtaggtcgat aaattggcct caccgtgaa
 40
 cgtgttgcg agattcaggt tgaaggcctg cgccgttgc gcgaaatcct gcaaacgcag
 gggctgaata tcgaagcgct gttccgcgag taa 993
 45
 <210> 4
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli
 50
 <220>
 <221> tRNA
 <222> (1)..(75)
 <223> supE-Allel
 55
 <400> 4
 tggggtatcg ccaagcggtt aggcacccgga ttcttaattcc ggcattccgaa ggttcgaatc 60
 ctcgtacccc agcca 75
 60